酵母来源α-1,2甘露糖转移酶Alg11的异源表达、纯化和活性分析[-]

李庆猛 李盛陶 王宁 高晓冬**

（江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室 无锡 214122）

摘要 糖基转移酶Alg11作为N-糖基化途径中一个重要蛋白，功能为催化将甘露糖转移到底物$DPGn_2M_3$（Dolichyl-pyrophosphate-$GlcNAc_2Mannose_3$）上进而生成$DPGn_2M_4$和$DPGn_2M_5$这两种多萜醇寡糖前体的反应。在本研究中，首先通过对酿酒酵母Alg11的蛋白质结构进行分析，设计了去除跨膜域的蛋白$Alg11_{45–548}$并成功在大肠杆菌中表达，进而对诱导时间、诱导剂浓度进行了产量最大化的优化，最终得到了纯化蛋白。以$PPGn_2$（Phytanyl-pyrophosphate-$GlcNAc_2$）为底物，利用体外表达的重组蛋白Alg1ΔTM和Trx-Alg2以酶法合成出Alg11的天然底物类似物$PPGn_2M_3$。用纯化的$Alg11_{45–548}$蛋白催化转糖基反应，并通过液质联用（LC-MS）的方法检测产物，证实$Alg11_{45–548}$蛋白具有催化$PPGn_2M_3$生成$PPGn_2M_4$和$PPGn_2M_5$的糖基转移酶活性。产物$PPGn_2M_5$通过不同的甘露糖苷酶酶切反应，验证了两个新加上的甘露糖以α-1,2糖苷键的形式连接到底物$PPGn_2M_3$上。底物特异性实验表明$Alg11_{45–548}$可以特异性识别底物$PPGn_2M_3$，而其他N-糖基化中间体类似物如$PPGn_2$和$PPGn_2M_1$无法被识别，且底物中的脂肪链结构也对酶的识别具有重要作用。Alg11的底物特异性保证了多萜醇寡糖前体的有序合成，具有重要的生理意义。

关键词 N-糖基化 糖基转移酶Alg11 液质联用（LC-MS） 诱导条件

[-] 国家自然科学基金（21778023）、江苏省自然科学基金（BK20170174）、中央高校自主科研计划青年基金（JUSRP11727）、江苏省现代工业发酵协同创新中心

**通讯作者，电子邮箱：xdgao@jiangnan.edu.cn

糖基化是自然界中发现的一种普遍的蛋白质修饰过程，其中包括N-糖基化，O-糖基化，GPI锚定等[1]。蛋白质的N-糖基化修饰发生在内质网和高尔基体中，内质网中的糖基化反应在各种生物具有高度保守性。在真核生物中，这些N-糖链在多种生理过程中发挥着关键作用，如蛋白质折叠、定位和分泌，同时与某些免疫反应相关[2]。

在内质网中，N-糖基化起始于磷酸多萜醇前体的合成，在一系列的Alg（Asparagine-linked glycosylation）糖基转移酶包括Alg7、Alg13、Alg14[3-5]、Alg1、Alg2、Alg11[6, 7]、Alg3、Alg9、Alg12、Alg6、Alg8、Alg10的催化作用下[8]，以四种不同的糖基为供体[9]，最终形成多萜醇寡糖前体（Dolichyl-pyrophosphate-$GlcNAc_2Mannose_9Glucose_3$）。最后在寡糖基转移酶复合体OST（Oligosaccharyltransferase complex）的催化下[10]，寡糖链被转移到新生多肽段表面的三联体序列Asn-X-Ser/Thr（N-X-S/T，X为脯氨酸以外的氨基酸）中的天冬酰胺（N）残基上[2]。

糖基转移酶Alg11作为N-糖基化过程中一个重要蛋白，其大小为63.1 kDa，荧光定位发现该蛋白质定位于酵母内质网上[11]，体外实验验证该酶在内质网膜外侧具有糖基转移酶活性。以$DPGn_2M_3$为底物，GDP-Man为糖基供体催化形成$DPGn_2M_4$和$DPGn_2M_5$的多萜醇寡糖前体[12]。在酵母中该基因的缺失可以导致N-糖基化不完全，酵母生长缓慢，并在37℃条件下出现致死的现象。人体中该基因的突变可以导致先天性糖基化缺陷CDG-I_P (congenital disorders of glycosylation, CDG)，严重影响人类的生长发育。在体外已经有许多研究对糖基转移酶Alg11功能以及特征进行表征，而这些研究使用的底物多为天然底物$DPGn_2M_3$[11, 12]。由于$DPGn_2M_3$从动植物组织中提取效率低，且$DPGn_2M_3$结构中多萜醇（Dolichol）的碳链较长，导致其合成和纯化难度很高，因此对于糖基转移酶Alg11结构以及酶学性质研究造成阻碍。具有与多萜醇类似结构而碳链较短的植醇（Phytol）成为体外合成Alg1/Alg2/Alg11复合体底物$DPGn_2$中脂肪链部分的首选[13, 14]。近年来开发出的通过化学法将植醇与壳二糖偶联合成出$PPGn_2$的方法，为研究N-糖基转移酶性质开辟了新途径[13]。此外，本实验室前期在大肠杆菌中表达了酵母来源的重组蛋白Alg1ΔTM和Trx-Alg2，并对其蛋白质性质进行了详细研究[15]。Alg1ΔTM和Trx-Alg2以$PPGn_2$为底物，GDP-Man为糖基供体经过两步催化生成糖基转移酶Alg11的适合底物$PPGn_2M_3$。利用化学酶法快速高效的合成底物类似物$PPGn_2M_3$对体外研究Alg11酶学性质提供了重要的底物基础。

与真核表达系统相比，原核表达系统具有操作简单，周期短，成本低的特点。本实验在原核表达系统中诱导表达酿酒酵母来源的重组Alg11并在体外得到纯化的蛋白，进而对其功能及生物学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

DNA聚合酶Primer Star GLX，DNA连接酶Ligation Mix购自大连宝生物工程公司；SDS-PAGE蛋白凝胶制备试剂盒，BCA蛋白浓度试剂盒，Clarity™ Western ECL Substrate显色剂购自碧云天生物；Anti-His Mouse mAb，Goat Anti-Mouse IgG HRP，BluePlus Ⅱ Protein Marker，1Kb Plus DNA Ladder购自北京全式金生物公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷，SanPrep胶回收试剂盒，SanPrep产物纯化试剂盒，SanPrep柱式质粒DNA小型抽提试剂盒购自生工生物工程公

司；甘露糖苷酶购自纽英伦生物技术有限公司；1 mL HisTrap HP 亲和层析柱、半干电转仪、ImageQuant™ LAS 4000 mini 显像仪购自美国通用电气公司；三重四极杆液质连用仪购自美国赛默飞世尔科技公司；液相色谱柱 1.7 μm 2.1×100 mm 购自美国沃特世公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 菌种，质粒和培养基

大肠杆菌 DH5α，表达菌株 Rosetta（DE3），载体 pET28a 均为本实验室保存。YT 培养基：1.6 % (W/V) 蛋白胨，1 % (W/V) 酵母提取物，0.5 % (W/V) NaCl；TB 培养基（1 L）：1.2 % (W/V) 蛋白胨，2.4 % (W/V) 酵母提取物，0.4 % (V/V) 甘油，17 mM KH_2PO_4，72 mM K_2HPO_4。

1.2 方法

1.2.1 Alg11 蛋白质跨膜域结构分析

将糖基转移酶 Alg11 的氨基酸序列（GB:AAB49937.1）输入到 TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）中，进行跨膜域结构分析。

1.2.2 pET28a-Alg11$_{45-548}$ 质粒的构建

通过蛋白质结构分析发现酿酒酵母 Alg11 具有一个 N 端的跨膜域，将其跨膜域移除得到截短型蛋白 Alg11$_{45-548}$。以酵母 W303a 基因组为模板扩增 ALG11$_{45-548}$ 目的基因片段，并在引物中分别加入 *BamH* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点，上游引物：AAAAGGATCCGTGTATTCCAGCTTGAATCC（划线部分为 *BamH* I 酶切位点），下游引物：AAAAAAGCTTTCAGCCCCTTTCCTCCTCTT（划线部分为 *Hind* III 酶切位点）。PCR 程序为：98℃预变性 10 min，98℃变性 10 s，55℃退火 30 s，68℃延伸 2 min，30 个循环后在 68℃延伸 2 min。目的片段经凝胶回收后通过双酶切插入至 pET-28a 载体的 *BamH* I 和 *Hind* III 位点之间。转化大肠杆菌 DH5α后经菌落 PCR、提质粒酶切等方法筛选出符合要求的阳性克隆，进行 DNA 测序验证。

1.2.3 蛋白的诱导表达纯化以及膜成分制备

将 pET28a-Alg11$_{45-548}$ 质粒转化到 Rosetta（DE3）大肠杆菌中得到重组菌 Rosetta（DE3）/pET28a-Alg11$_{45-548}$。挑取单菌落接种到含有 50 μg/L 卡那霉素和 34 μg/mL 氯霉素的 5 mL YT 培养基中，37℃、220 r/min 过夜培养（约 12 小时）。按照 1 %接种于含有同浓度卡那霉素和氯霉素的新鲜 TB 培养基中，37℃、220 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6 时，将摇床温度调至 16℃，取 1 mL 菌液作诱导前对照，待培养基温度降低后添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-Thiogalactoside，IPTG)，诱导温度 16℃，220 r/min。诱导后取 1 mL 菌液作诱导后对照，9000 r/min，4℃离心 5 min 收集菌体。用缓冲液 I（150 mM NaCl；50 mM Tris-HCl，pH 8.0）重悬菌体，将菌体冰浴超声破碎（超声 5 s，停 5 s，持续 20 min）后 15000 r/min，4℃离心 30 min。离心上清液经过 1 mL HisTrap HP 亲和层析柱后，经过缓冲液 I 和缓冲液 II（150 mM NaCl；50 mM Tris-HCl；60 mM 咪唑，pH 8.0）洗脱，最后用缓冲液III（150 mM NaCl；50 mM Tris-HCl；500 mM 咪唑，pH 8.0）洗脱。收集各部分流穿液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，对检测到目的条带的蛋白溶液进行透析除盐处理、浓缩后，进行蛋白活性鉴定。

另外，实验用到的 Alg1ΔTM 和含有 Trx-Alg2 的大肠杆菌膜的制备方法参考文献[15, 16]。流程如下：将 pET28a-Alg1ΔTM 和 pET32a-Trx-Alg2 质粒转化到 Rosetta（DE3）大肠杆菌中，蛋白质表达步骤同 Alg11$_{45-548}$。

Alg1ΔTM 纯化方法：收集到的菌体经过超声破碎后，15000 r/min，4℃离心 99 min。弃上清，将沉淀用缓冲液Ⅳ（150 mM NaCl；50 mM Tris-HCl；1% Triton X-100，pH 8.0）吹打混匀，在冰上孵育 30 min。15000 r/min，4℃

离心 30 min，离心后得上清经过 1 mL His Trap HP 亲和层析柱后，经过缓冲液Ⅳ洗脱杂蛋白，用含 60 mM 咪唑缓冲液Ⅳ洗脱非特异性杂蛋白，最后用含 500 mM 咪唑缓冲液Ⅳ洗脱目的蛋白，经过蛋白透析浓缩得到 Alg1ΔTM。

含有 Trx-Alg2 的大肠杆菌膜制备方法：收集到的菌体经过超声破碎后，4000 r/min，4℃离心 20 min。取上清部分用 60000 r/min，4℃离心 60 min。弃上清，保留沉淀部分。沉淀部分用缓冲液Ⅴ（20 mM MES；10 mM $MgCl_2$；1 mM DTT；30 %甘油，pH 6.0）重新溶解，即得到含有 Trx-Alg2 的大肠杆菌膜。

1.2.4 蛋白质印迹法检测蛋白表达

用 12 %的 SDS-PAGE 检测蛋白 $Alg11_{45-548}$的表达情况。半干法转膜后 5 %脱脂牛奶封闭 1 小时；一抗 Anti-His Mouse mAb 稀释 5000 倍，室温孵育 1 小时；二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 稀释 5000 倍，室温孵育 1 小时；用 Clarity™ Western ECL Substrate 显色液显色，ImageQuant™ LAS 4000 mini 显像系统对电泳结果进行分析。

1.2.5 $Alg11_{45-548}$ 的活性测定

$Alg11_{45-548}$催化的糖基反应条件如下：底物为 $PPGn_2M_3$，GDP-Man 为糖基供体，纯化的 $Alg11_{45-548}$进行催化，最后液质联用方法检测终产物。$PPGn_2M_3$的反应体系如下：$PPGn_2$（50 μM），GDP-Man（2 mM），Alg1ΔTM（80 ng/mL）和含有 Trx-Alg2 的大肠杆菌膜（150 μg/mL）反应缓冲液（20 mM Tris-HCl，1 mM 二硫苏糖醇，0.15 mM 乙二胺四乙酸，0.13 % NP-40 和 10 mM $MgCl_2$（50 μL，pH 7.2）[15, 16]。30 ℃反应 12 小时后，加入纯化的 $Alg11_{45-548}$（100 μg/mL），继续在 30℃反应 12 小时。反应结束后加入 40 mM 的盐酸溶液，混合震荡均匀后 100℃加热 1 小时，使糖链与脂肪链之间磷酸键断裂。加入 2 %的乙腈溶液于反应液中，剧烈震荡后 15000 r/min 离心 10 min，取上清液使用固相萃取方法纯化糖链。上样后先用 10 mL 2 %的乙腈洗脱，然后用 3 mL 25 %的乙腈洗脱，并收集流穿液，冷冻干燥后重溶于纯水中。糖链用液质联用方法进行检测，液相条件为：流动相 A 乙腈，流动相 B 纯水；梯度: 0-2 min，20 % B；2-15 min，20-50 % B；15-18 min，50 % B；流速：0.2 mL/min，柱温 40℃。质谱条件为：正离子模式，检测范围 400-1600 m/z。

1.2.6 甘露糖苷酶鉴定甘露糖之间链键

水解后的糖链重溶于 40 μL 纯水中，取 7 μL 的重溶糖链（Gn_2M_5），加入 3 mU 的α-1,2、α-1,6、α 1-2,3 甘露糖苷酶，2 μL 的 5×反应缓冲液。反应置于 30℃ 12 小时后，100℃加热处理 10 min。15000 r/min 离心 10 min，取上清检测终产物，检测方法与 1. 2. 4 相同。

1.2.7 $Alg11_{45-548}$ 底物特异性

以不同底物测试酶底物特异性，包括 $PPGn_2$、$PPGn_2M_1$、$PPGn_2M_3$ 和 Gn_2M_3。$PPGn_2M_1$ 由起始底物 $PPGn_2$，Alg1ΔTM 反应得到；$PPGn_2M_3$ 由起始底物 $PPGn_2$，Alg1ΔTM 和 Trx-Alg2 反应得到；Gn_2M_3 由 $PPGn_2M_3$ 酸解纯化得到。反应及检测方法与 1. 2. 4 相同。

2 结果与讨论

2.1 Alg11 蛋白质跨膜域结构分析

从图 1 可以看出，糖基转移酶 Alg11 在 N 端具有一个跨膜结构域（Transmembrane domain，TMD），所属氨基酸为 23-45 位，其中第 1-22 位氨基酸位于膜内侧，第 46-548 位氨基酸位于膜外侧。根据文献报道，将其跨膜域移除，截短型蛋白 $Alg11_{45-548}$ 在酵母中仍具有糖基转移酶活性，为体外表达糖基转移酶 Alg11 提供了一定的实验基础[12]。

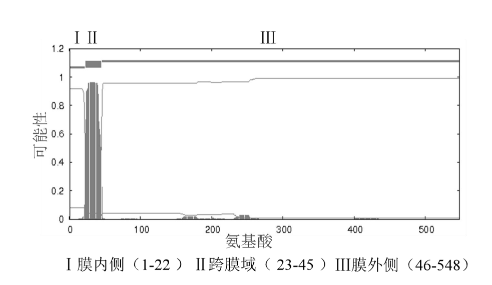


图 1 Alg11 蛋白质跨膜域结构分析

Fig. 1 Analysis of the transmembrane domain structure of Alg11 protein

2.2 Alg11$_{45-548}$ 基因扩增及表达质粒的构建与鉴定

表达质粒 pET28a-Alg11$_{45-548}$ 结构如图 2a。目的基因 Alg11$_{45-548}$ 从酵母基因组 PCR 扩增后电泳验证（图 2b），PCR 产物显示唯一条带，大小位于 1500 bp 左右，与理论值 1515 bp 相一致。构建好的表达质粒经酶切后电泳验证（图 2c），显示为得到两个条带，下端条带大小与 PCR 产物一致，应为目的基因条带；上端条带为载体片段。该质粒经过测序验证无碱基突变，说明表达质粒构建成功。

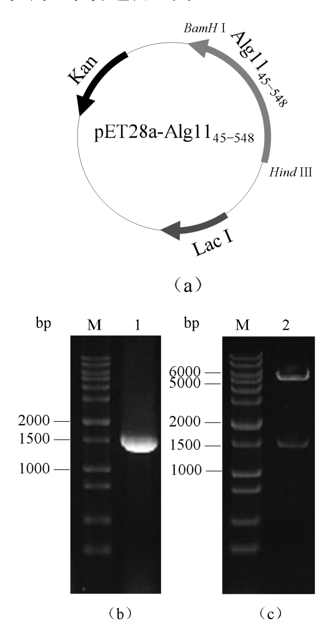


图 2 表达质粒 pET28a-Alg11$_{45-548}$ 的构建

Fig. 2 Construction of pET28a-Alg11$_{45-548}$

(a) plasimid map of pET28a-Alg11$_{45-548}$（b） PCR amplification of Alg11$_{45-548}$ from genome, M: 1 Kb plus DNA marker, 1: PCR product of Alg11$_{45-548}$ (c) identification of recombinant expression vector, M: 1 Kb plus DNA marker, 2: pET28a-Alg11$_{45-548}$ digested with *BamH* I 和 *Hind* III

2.3 诱导时间和 IPTG 浓度对蛋白表达的影响

重组菌在 TB 培养基中诱导表达过程中，从加入诱导剂 IPTG 开始，每隔一小时取样一次，离心收集菌体检测蛋白表达水平（图 3）。利用蛋白质印迹法检测目的蛋白表达水平，从 2 小时开始，目的蛋白开始表达。随着时间推移，目的蛋白的条带逐渐清晰，蛋白条带位于 50-70 kDa 之间。当诱导时间 20 小时，目的蛋白条带积累达到最高（图 3a）。

重组菌在 TB 培养基中诱导表达过程中，加入不同浓度的诱导剂，16℃诱导 20 小时后收集菌体检测目的蛋白的表达情况（图 3）。当 IPTG 浓度为 10-100 μM 时，目的蛋白表达量与 IPTG 浓度呈现正比例提高，分别是 100 μM 时的 0.28、0.72、0.95 倍。当 IPTG 浓度为 100 μM 时，目的蛋白的表达量达到最高。当 IPTG 浓度为超过 100 μM 时，目的蛋白的表达量减少，分别是 100 μM 时的 0.72、0.56、0.87 倍（图 3b）。为了获得更多的目的蛋白，本实验采用的诱导时间为 20 小时，IPTG 浓度为 100 μM。

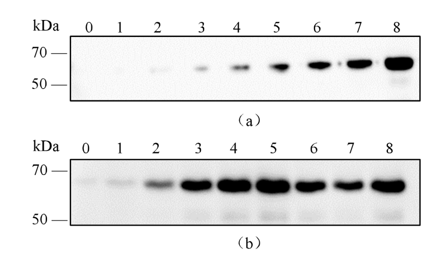


图 3 诱导时间（a）和 IPTG 浓度（b）对目的蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of induction time (a) and IPTG concentration (b) on protein expression

Expression of recombinant protein in different time and IPTG concentration. (a) 0: 0 h; 1: 1 h; 2: 2h; 3: 3 h; 4: 4 h; 5: 5 h; 6: 6h; 7: 7 h; 8: 20 h, 100 μM IPTG. (b) 0: 0 μM IPTG; 1: 10 μM IPTG; 2: 25 μM IPTG; 3: 50 μM IPTG; 4: 75 μM IPTG; 5: 100 μM IPTG; 6: 500 μM; 7: 1000 μM IPTG; 8: 2000 μM IPTG, 20 h

2.4 Alg11$_{45-548}$ 目的蛋白的纯化

重组菌在 TB 培养基中诱导培养 20 小时，IPTG 浓度为 100 μM。离心收集菌体，超声破碎后离心收集上清。用 1 mL HisTrap 亲和层析柱进行纯化，洗脱液用 12% SDS-PAGE 分析。

从蛋白电泳图中得到（图 4a），与诱导前相比，诱导后在 50-70 kDa 之间出现一条明显的蛋白条带，目的蛋白的理论分子量为 57.8 kDa，相对分子质量和预期的大小一致，表明蛋白在大肠杆菌中表达成功。经过纯化后得到一条清晰的蛋白条带，与诱导后条带相一致。用抗 His-tag 多克隆抗体对纯化后的蛋白进行 Western blot 验证（图 4b），与诱导前相比，诱导后和纯化后出现一条特异性条带，且蛋白条带大小与目的蛋白一致，位于 50-70 kDa 之间，表明目的蛋白成功从大肠杆菌破碎上清液中纯化得到。对含有目的蛋白的洗脱液进行透析浓缩处理，产量约为 1.75 mg/100 mL 培养基。

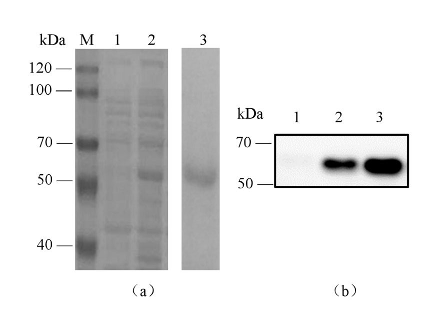


图 4 全细胞和纯化后蛋白质电泳图(a)和 Western blot 验证图（b）

Fig.4 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) of recombinant cell and purified Alg11$_{45-548}$

(a) Samples were applied to gel electrophoresis followed by staining with Coomassie brilliant blue R-250 (b) Western blot verification of the purified protein. M: Marker; 1: Whole cell before inducing; 2: Whole cell after inducing with 100 µM IPTG; 3: purified Alg11$_{45-548}$

2.5 Alg11$_{45-548}$ 活性分析

以 PPGn$_2$ 为起始底物，由 Alg1 ΔTM 和 Trx-Alg2 催化得到 PPGn$_2$M$_3$，纯化后的 Alg11$_{45-548}$ 加入到反应体系反应 12 小时后，PPGn$_2$M$_3$ 转化形成 PPGn$_2$M$_5$，经过稀盐酸的裂解将糖链与脂肪链分离开，运用液质联用的方法检测糖链（图 5a）。在反应前底物酸解得到的糖链 Gn$_2$M$_3$ 在液相中洗脱时间为 12.49 和 12.71 min；当反应时间 4 小时，产物 Gn$_2$M$_4$ 和 Gn$_2$M$_5$ 生成，洗脱时间分别为 13.65 和 14.58 min，中间体 Gn$_2$M$_4$ 的积累量很少，说明第二步的酶催化反应效率很高。当反应时间 12 小时，底物 Gn$_2$M$_3$ 和中间体 Gn$_2$M$_4$ 完全消失，只有终产物 Gn$_2$M$_5$ 存在（图 5b）。质谱验证各糖链的分子量，结果显示所有糖链离子峰均为分子量加钠峰$[M+Na]^+$。其中底物 Gn$_2$M$_3$ 离子峰为 933.23 m/z；中间体 Gn$_2$M$_4$ 离子峰为 1095.22 m/z；终产物 Gn$_2$M$_5$ 离子峰为 1257.43 m/z（图 5c）。各糖链离子峰依次增加 162（已糖脱除一个水分子），可以证实底物 PPGn$_2$M$_3$ 与糖基供体 GDP-Man 反应生成 PPGn$_2$M$_4$ 和 PPGn$_2$M$_5$。

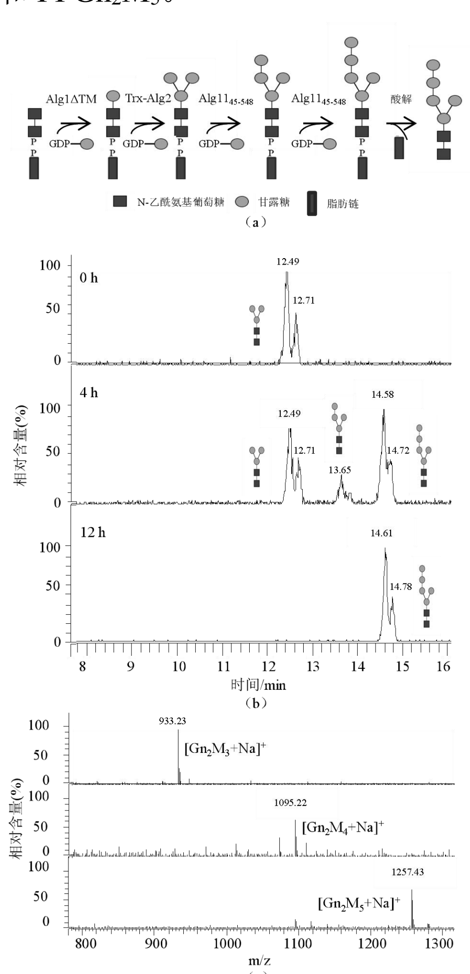


图 5 重组蛋白活性分析及产物检测

Fig.5 The oligosaccharide was detected by LC-MS

(a) A schematic diagram of glycosylation of Alg1ΔTM, Trx-Alg2 and $Alg11_{45\text{-}548}$ (b) Elution time of various oligosaccharide in Ultra Performance Liquid Chromatography (c) Ion peaks of different oligosaccharides in mass spectrometry

2.6 甘露糖苷酶鉴定产物结构

为了鉴定新添加的两个甘露糖与底物 $PPGn_2M_3$ 之间的糖苷键，本文运用甘露糖苷酶酶切的方法进行验证。将糖链 Gn_2M_5（图 6，A）分别经过α-1,2 甘露糖苷酶酶切（图 6，B），α 1-2,3 甘露糖苷酶酶切（图 6，C），α 1-2,3 和α-1,6 甘露糖苷酶酶切（图 6，D），α-1,6 甘露糖苷酶酶切（图 6，E），检验糖链变化分析糖链结构。α-1,2 甘露糖苷酶酶切后糖链洗脱时间为 12.59 和 12.71 min，质谱检测结构为 Gn_2M_3，说明新生成的两个甘露糖α-1,2 糖苷键形式连接到底物 $PPGn_2M_3$（图 6，B）；α 1-2,3 甘露糖苷酶酶切后的糖链洗脱时间为 10.78 和 10.88 min，质谱鉴定结构为 Gn_2M_2（图 6，C）；α 1-2,3 和α-1,6 甘露糖苷酶酶切后糖链洗脱时间为 9.05 和 9.35 min，质谱鉴定糖链为 Gn_2M_1（图 6，D）；α-1,6 甘露糖苷酶酶切后洗脱的仍然为 Gn_2M_5，洗脱时间为 14.60 和 14.77 min，该现象由于α-1,6 甘露糖苷酶无法识别具有α-1,3 支链的α-1,6 甘露糖（图 6，E）。本实验用甘露糖苷酶酶切方法验证了新生成的两个甘露糖均以α-1,2 糖苷键的连接方式与 $PPGn_2M_3$ 相连，该连接方式与以前报道的连接方式相同[11]。

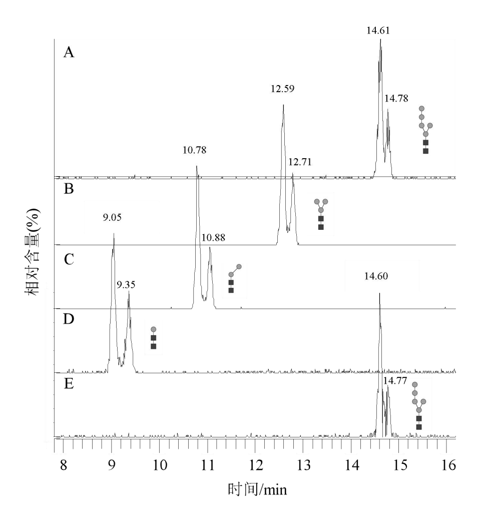


图 6 甘露糖苷酶验证产物

Fig.6 Product verification by Mannosidases

Ultra Performance Liquid Chromatography profiles of: A: Gn_2M_5 B-E: oligosaccharide after digesting Gn_2M_5 by different mannosidase. B: α-1,2 mannosidase; C: α 1-2,3 mannosidase; D: α 1-2,3 and α-1,6 mannosidase; E: α-1,6 mannosidase

2.7 $Alg11_{45\text{–}548}$ 的底物特异性

在体内 Alg11 以 $DPGn_2M_3$ 为底物合成 $DPGn_2M_4$ 和 $DPGn_2M_4$。为了验证 N-糖基化中间体 $DPGn_2$ 和 $DPGn_2M_1$ 能否被 Alg11 利用，通过化学酶法合成 N-糖基化中间体类似物 $PPGn_2$、$PPGn_2M_1$、$PPGn_2M_3$，在体外验证 $Alg11_{45\text{–}548}$ 的底物特异性。当底物为 $PPGn_2M_3$ 时反应可以生成 $PPGn_2M_5$，在液相中洗脱峰为 Gn_2M_5（图 7，A）；当底物为 $PPGn_2$ 时，在液相中洗脱的糖链为 Gn_2，洗脱时间为 5.86 和 6.25 min（图 7，B）；当底物为 $PPGn_2M_1$ 时，在液相中洗脱的糖链为 Gn_2M_1，洗脱时间为 9.05 和 9.45 min（图 7，C）。说明在体外 $Alg11_{45\text{–}548}$ 依然保持 N-糖基化的保守性，特异性识别唯一底物 $PPGn_2M_3$，$PPGn_2$ 和 $PPGn_2M_1$ 不能被识别。为了验证底物中脂肪链对酶识别底物影响，将 $PPGn_2M_3$ 用稀酸酸解纯化出 Gn_2M_3。当底物为 Gn_2M_3 时，在液相中洗脱的糖链仍为 Gn_2M_3，洗脱时间为 12.56 和 12.76 min（图 7，D），表明该酶无法识别糖链 Gn_2M_3，底物 $PPGn_2M_3$ 中的脂肪链结构对酶识别底物起到重要作用。

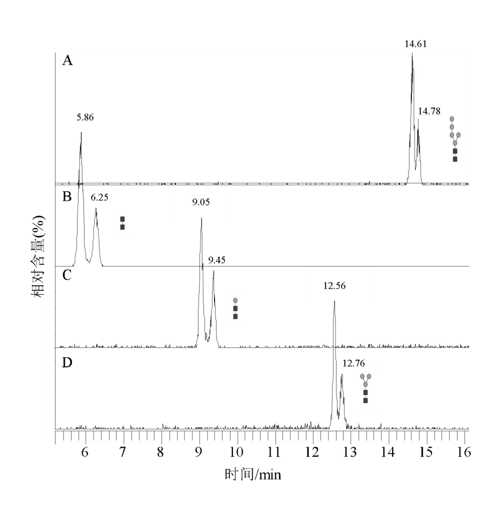


图 7 Alg11$_{45-548}$的底物特异性

Fig.7 The substrate specificity of Alg11$_{45-548}$

Reactions with different substrates. A: PPGn$_2$M$_3$; B: PPGn$_2$; C: PPGn$_2$M$_1$; D: Gn$_2$M$_3$

3 结论

本研究成功地在大肠杆菌中表达了酵母来源的 Alg11 并对其进行了纯化。通过分析 Alg11 蛋白质跨膜域结构发现其具有一个明显的 N 端跨膜域结构，将跨膜域移除后进行重组表达，构建出能够可溶性表达的 Alg11$_{45-548}$蛋白。研究中，首先对蛋白表达的诱导时间，诱导剂浓度等诱导条件进行优化发现当诱导时间为 20 小时，诱导剂浓度为 100 μM 时，目的蛋白的表达量达到最高。随后，在体外对纯化的 Alg11$_{45-548}$进行生物活性分析，证实 Alg11$_{45-548}$具有催化 PPGn$_2$M$_3$形成 PPGn$_2$M$_4$和 PPGn$_2$M$_5$的糖基转移酶生物学功能。在用不同甘露糖苷酶进行产物鉴定时，证明 PPGn$_2$M$_5$中新加上的两个甘露糖以α-1,2 糖苷键的形式连接到底物 PPGn$_2$M$_3$上。最后，以 N-糖基化过程的中间体类似物 PPGn$_2$、PPGn$_2$M$_1$和 PPGn$_2$M$_3$为底物，在体外证明 Alg11 特异性识别底物 PPGn$_2$M$_3$，同时证明底物 PPGn$_2$M$_3$中脂肪链结构对酶识别底物具有重要作用。本研究对 N-糖基化过程中糖基转移酶 Alg11 的体外活性进行了研究，为研究 Alg11 酶学性质以及结构解析提供帮助，同时，反应中生成的产物 PPGn$_2$M$_5$为 N-糖基化后续反应中的翻转酶和糖基转移酶 Alg3 提供了底物，而且本实验运用液质联用的方法检测酵母来源的 Alg11 的活性，为体外研究 CDG-I$_P$病人中糖基转移酶 Alg11 突变体活性提供了新的方法。

参 考 文 献

[1] WIEDERSCHAIN G Y. Essentials of glycobiology [J]. Biochemistry (Moscow), 2009, 74(9): 1056-.

[2] LARKIN A, IMPERIALI B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation [J]. Biochemistry, 2011, 50(21): 4411-26.

[3] BICKEL T, LEHLE L, SCHWARZ M, et al. Biosynthesis of Lipid-linked Oligosaccharides in Saccharomyces cerevisiae Alg13p AND Alg14p FORM A COMPLEX REQUIRED FOR THE FORMATION OF GlcNAc2-PP-DOLICHOL [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(41): 34500.

[4] GAO X D, TACHIKAWA H, SATO T, et al. Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(43): 36254.

[5] XD G, S M, N M, et al. Interaction between the C termini of Alg13 and Alg14 mediates formation of the active UDP-N-acetylglucosamine transferase complex [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(47): 32534-41.

[6] O'REILLY M K, ZHANG G, IMPERIALI B. In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis [J]. Biochemistry, 2006, 45(31): 9593.

[7] RAM REZ A S, BOILEVIN J, LIN C W, et al. Chemo-enzymatic synthesis of lipid-linked GlcNAc2Man5 oligosaccharides using recombinant Alg1, Alg2 and Alg11 proteins [J].

Glycobiology, 2017, 1-8.

[8] BURDA P, AEBI M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1999, 1426(2): 239-57.

[9] SCHWARZ F, AEBI M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation [J]. Current opinion in structural biology, 2011, 21(5): 576-82.

[10] JR D R, IMPERIALI B. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6(6): 844-50.

[11] CIPOLLO J F, TRIMBLE R B, CHI J H, et al. The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum [J]. The Journal of biological chemistry, 2001, 276(24): 21828-40.

[12] ABSMANNER B, SCHMEISER V, KAMPF M, et al. Biochemical characterization, membrane association and identification of amino acids essential for the function of Alg11 from Saccharomyces cerevisiae, an alpha1,2-mannosyltransferase catalysing two sequential glycosylation steps in the formation of the lipid-linked core oligosaccharide [J]. The Biochemical journal, 2010, 426(2): 205-17.

[13] FLITSCH S L, PINCHES H L, TAYLOR J P, et al. Chemo-enzymatic synthesis of a lipid-linked core trisaccharide of N-linked glycoproteins [J]. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1992, 16): 2087.

[14] WILSON I B, TAYLOR J P, WEBBERLEY M C, et al. A novel mono-branched lipid phosphate acts as a substrate for dolichyl phosphate mannose synthetase [J]. Biochemical Journal, 1993, 295 (Pt 1)(1): 195.

[15] LI S T, WANG N, XU S, et al. Quantitative study of yeast Alg1 beta-1, 4 mannosyltransferase activity, a key enzyme involved in protein N-glycosylation [J]. Biochimica et biophysica acta, 2017, 1861(1 Pt A): 2934-41.

[16] LI S-T, WANG N, XU X-X, et al. Alternative routes for synthesis of N-linked glycans by Alg2 mannosyltransferase [J]. The FASEB Journal, 2017, fj. 201701267R.

Expression, purification and activity assay of yeast α-1,2 mannosyltransferase Alg11

LI Qing-meng LI Sheng-tao WANG Ning GAO Xiao-dong

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Glycosyltransferase Alg11, which is an important protein in N-glycosylation pathway, transfers the mannose moiety from GDP-Man to $DPGn_2M_3$ (Dolichyl-pyrophosphate-$GlcNAc_2Mannose_3$), forming $DPGn_2M_4$ and $DPGn_2M_5$ LLO (lipid-linked oligosaccharide) precursors. The structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Alg11 showed the prediction of a hydrophobic N-terminal transmembrane domain. Thus, truncated Alg11 lacking the first 44 amino acid was designed and successfully overexpressed in *Escherichia coli*. The induction time and inducer concentration were optimized and the recombinant protein $Alg11_{45\text{-}548}$ was purified. After the transferase activity assay, reaction mixture was applied to the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS), which showed $Alg11_{45\text{-}548}$ was capable to generate $PPGn_2M_5$ (Phytanyl-pyrophosphate-$GlcNAc_2Mannose_5$) from substrate $PPGn_2M_3$. Structural analysis of Gn_2M_5 showed the newly formed two glycosidic bonds could be cleaved by α-1,2 mannosidase, meaning the two mannose moieties were attached to

Gn_2M_3 by α-1,2 linkages. Substrate specificity assay indicated the recombinant Alg11 specifically recognized $PPGn_2M_3$ rather than other LLOs, such as $PPGn_2$ and $PPGn_2M_1$. Additionally, oligosaccharide Gn_2M_3 was not elongated by $Alg11_{45\text{-}548}$, suggesting the lipid chain in the substrate $PPGn_2M_3$ was critical for the recognition. The achievement of active Alg11 provides an effective tool for producing Gn_2M_5, as well as for the further investigation of kinetic and mechanistic features of related mannosyltransferases.

Key words N-glycosylation glycosyltransferase Alg11 liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS) induction condition